

厦门大学

硕士学位论文

大黄鱼免疫相关基因的筛选和鉴定

Identification And Characterization Of Immune Relevant Genes
From Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena Crocea*)

郑文彪

指导教师姓名：陈新华 研究员

徐 洵 教授

专 业 名 称：生化与分子生物学

论文提交日期：2006 年 10 月 26 日

论文答辩时间：2006 年 12 月 10 日

学位授予日期：2006 年 月 日

答辩委员会主席：李祺福

评 阅 人：

2006 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式表明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其他指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非营利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密学位论文在解密后适用本规定。

本论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()。

(请在以上相应括号内打√)

作者签名:

日期:

年

月

日

导师签名:

日期:

年

月

日

目录

摘要	错误! 未定义书签。
Abstract.....	错误! 未定义书签。
一、前言.....	错误! 未定义书签。
1.1 大黄鱼简介.....	错误! 未定义书签。
1.2 鱼类分子免疫学研究进展.....	错误! 未定义书签。
1.2.1 非特异性免疫识别系统.....	错误! 未定义书签。
1.2.2 鱼类补体系统.....	错误! 未定义书签。
1.2.3 鱼类干扰素系统基因研究.....	错误! 未定义书签。
1.2.4 非特异性细胞杀伤作用.....	错误! 未定义书签。
1.3 鱼类分子免疫学研究方法.....	错误! 未定义书签。
1.3.1 同源预测法.....	错误! 未定义书签。
1.3.2 EST 测序和差减杂交获得大量免疫分子.....	错误! 未定义书签。
1.3.3 直接功能筛选法.....	错误! 未定义书签。
1.3.4 比较基因组学.....	错误! 未定义书签。
1.3.5 比较功能蛋白质组学.....	错误! 未定义书签。
二、材料和方法.....	错误! 未定义书签。
2.1 材料.....	错误! 未定义书签。
2.2 实验方法.....	错误! 未定义书签。
三、结果与讨论.....	错误! 未定义书签。
3.1 CDNA 文库构建以及 EST 序列分析.....	错误! 未定义书签。
3.1.1 mRNA 的提取及 cDNA 的合成.....	错误! 未定义书签。
3.1.2 文库质量评价.....	错误! 未定义书签。
3.1.3 EST 测序结果.....	错误! 未定义书签。
3.1.4 小结.....	错误! 未定义书签。
3.2 GILT 基因克隆和鉴定.....	错误! 未定义书签。
3.2.1 GILT 全长基因分析.....	错误! 未定义书签。
3.2.2 大黄鱼 GILT 基因的基因组序列分析.....	错误! 未定义书签。
3.2.3 Gilt 基因的表达调控分析.....	错误! 未定义书签。
3.2.4 讨论.....	错误! 未定义书签。
3.2.5 小结.....	错误! 未定义书签。
3.3 大黄鱼 G 型溶菌酶克隆鉴定和活性分析.....	错误! 未定义书签。
3.3.1 大黄鱼 G 型溶菌酶的 CDNA 克隆.....	错误! 未定义书签。
3.3.2 大黄鱼溶菌酶基因组结构克隆和分析.....	错误! 未定义书签。
3.3.3 大黄鱼溶菌酶在毕氏酵母中的表达.....	错误! 未定义书签。
3.3.4 大黄鱼溶菌酶的纯化.....	错误! 未定义书签。
3.3.5 大黄鱼溶菌酶活性测定.....	错误! 未定义书签。
3.3.6 大黄鱼溶菌酶的表达模式分析.....	错误! 未定义书签。
3.3.7 讨论.....	错误! 未定义书签。
参考文献.....	错误! 未定义书签。
致谢	错误! 未定义书签。

大黄鱼免疫相关基因的筛选及鉴定

摘要

大黄鱼是我国特有的经济鱼种，由于人工养殖技术的成熟使其成为目前网箱养殖量最大的经济鱼类，但是随着养殖量的增加和养殖环境的破坏，导致大面积细菌性疾病和病毒性疾病的爆发，给大黄鱼的养殖业造成了巨大的损失。为了更好了解研究大黄鱼的免疫系统为将来的大黄鱼养殖的疾病防治提供有效支持，我们进行如下工作：

1. 构建了polyIC诱导的CDNA SMART文库，并进行了1039个EST随机测序，发现了252个基因，其中包括了46个免疫相关基因，这些免疫相关基因广泛地参与了免疫应答包括补体系统，干扰素系统，抗原加工提呈系统，免疫球蛋白等重要免疫亚系统，而且还首次报道了hepcidin的切割位点的多态性，采用半定量PCR分析几个免疫相关基因发现Mx protein, β 2m, placenta-specific 8 genes, Cyba 和CDBP2在poly IC诱导之后会上调表达，初步表明这些基因参与了大黄鱼的免疫应答中。

2. 克隆分析 γ -干扰素诱导的溶酶体硫还原酶（GILT）基因，GILT是目前在哺乳动物中唯一发现的可以在溶酶体的酸性环境中催化还原二硫键的硫还原酶，它催化还原二硫键从而帮助蛋白去折叠使之容易被溶酶体中的蛋白酶降解加工成抗原肽。大黄鱼的GILT CDNA全长1033bp，编码256个氨基酸，理论分子量为29.3KD，在NCBI上进行比对分析表明，它分别与斑马鱼、人、小鼠、大鼠、狗的GILT 蛋白有着54.1%，43.2%，40.0%，39.4%，and 39.2%同源性。初步序列结构分析表明所克隆到的GILT基因含有一个保守的CXXC（74~77）motif，一段gilt特征序列CQHGX2ECX2NX4C（119~134），六个重要的半胱氨酸，两个N-糖基化位点。根据这些序列资料可以初步判断所克隆到的基因是哺乳动物GILT的同源蛋白。进一步的基因组结构分析表明大黄鱼的GILT基因组结构与哺乳动物的GILT基因组结构具有一样内含子/外显子结构。利用三联细菌疫苗刺激大黄鱼分析GILT的表达调控模式发现，GILT在三联细菌疫苗刺激之后在脾脏和肾脏上调表达，而在肝、脑、鳃、心脏只有组成型表达，这个结果进一步确定了GILT参与了大黄鱼的免疫

应答。通过搜索NCBI数据库我们找到的pufferfish的BAC文库中一个克隆含有GILT的全基因，继续在这个序列分析发现在GILT转录起始位点上游有两个GAS位点（TTCNNNGAA 和TCCNNNGAA）。GAS位点是 γ -干扰素通过JAK-STAT信号传导通道激活目标基因表达的重要启动子，这个发现更进一步说明了鱼类GILT基因具有与哺乳动物中的GILT基因相似作用，也说明了 γ -干扰素的JAK-STAT信号传导通道在鱼类也是保守的。

3. 克隆分析了大黄鱼G-型溶菌酶基因，大黄鱼G-型溶菌酶的CDNA全长716bp，编码193个氨基酸，理论分子量21KD，在NCBI上进行比对分析表明它与其他物种的G-型溶菌酶相似度为40~85%。初步的序列结构分析表明大黄鱼溶菌酶具有保守的酶催化位点（E71, D84, D101）和酶结合位点（L97, L121, L128, G152），基因组结构分析它具有和其他鱼类的相似的内含子/外显子结构，表达调控分析表明大黄鱼G-型溶菌酶在小肠，心脏，肝脏，脾脏，肾脏，鳃当中都有组成形表达，在三联疫苗刺激之后溶菌酶在小肠，脾脏，肾脏中表达量上调8~10倍，而在其他的组织只有波动表达，这个结果说明了G-型溶菌酶在天然免疫应答中重要的作用。另外采用甲醇诱导的毕氏酵母表达系统体外表达溶菌酶，并检测体外表达的G-溶菌酶的溶菌活力，发现它对革兰氏阳性菌溶壁微球菌(*M.lysodeikticus*)，以及革兰氏阴性菌温和气单胞菌(*A.sobria*)，溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)，副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)，创伤弧菌(*V.vulnificus*)均有溶菌作用，这些革兰氏阴性菌都是主要的水产养殖病害菌，这些结果为将来水产养殖疾病防治奠定了良好的基础。

关键词：大黄鱼；GILT；G型溶菌酶

Abstract

Large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), is a species of jewfish and is found mainly in the coast in the temperate zone. Large yellow croaker is an economically important marine fish species in China, and also represents the largest yield for a single species in Chinese marine net-cage farming. In recent years, with the rapid development of large yellow croaker culture industry, the infectious diseases caused by viruses, bacteria, and parasites are becoming more and more severe, resulting in great economical losses. At present little is known about the genetic and immunological basis of this fish. This lack of knowledge may represent a major obstacle that hinders the establishment of effective measures in disease control and genetic improvement.

To better understand the molecular mechanism of the immune system of large yellow croaker and increase genomic resources in cultured fish, we constructed a cDNA library from mRNA isolated from the spleens of large yellow croaker stimulated with a viral mimic, polyinosinic polycytidylic acid (poly I: C). 1039 ESTs from the library were sequenced and compared with sequences in GenBank, and 252 genes were identified by EST analysis, of which 46 genes may be implicated in the immune functions, including complement system components, immunoglobulins, antigen processing and presentation proteins, interferon system proteins, cytokines, and some innate defense molecules. The expression analysis of selected genes during polyI:C induction was performed by reverse transcription-PCR (RT-PCR), including Mx protein, beta2-microglobulin (β_2m), CD2 binding protein 1 (CD2BP1), placenta-specific 8 genes, MHC class II associated invariant chain (li) and Cytochrome b-245 alpha peptide (Cyba). The results revealed that expression levels of Mx protein, β_2m ,

placenta-specific 8 genes, and *Cyba* were significantly upregulated at 30h after induction with poly I:C, and the CD2BP1 expression was also induced by poly I:C, suggesting that these genes may be involved in an immune response induced by poly I:C in large yellow croaker. In this study we also report two novel immune-related genes (CD2BP and placenta-specific 8 gene) and the presence of polymorphism at the maturation site of hepcidin.

Based on the work of large yellow croaker EST project, we further clone and analyze interferon- γ -inducible-lysosomal thiol reductase (GILT) gene of large yellow croaker. In mammals, GILT has been demonstrated to play a key role in the processing and presentation of MHC class II-restricted antigen (Ag) by catalyzing disulfide bond reduction, thus unfolding native protein Ag and facilitating subsequent cleavage by proteases. Here, we reported the cloning of a GILT gene homologue from the spleen of large yellow croaker (LycGILT). The full length cDNA of LycGILT gene is 1033 nucleotides (nt) encoding a protein of 256 amino acids (aa), with a putative molecular weight of 28.9 kDa. The deduced protein is highly homologous to that of mammalian and zebrafish GILTs and shares 54.1% sequence identity to that of zebrafish and 43.2%-39.2% sequence identity to that of various mammals. The deduced LycGILT possesses the typical structural feature of mammalian GILT, including an active-site CXXC motif, a GILT signature sequence CQHGX2ECX2NX4C, and other six cysteines responsible for the formation of disulfide bonds in the C-terminus. Genomic analysis revealed that LycGILT gene, spanning a 3159 nt fragment, contained seven exons interrupted by six introns and exhibited a similar exon-intron organization to human and mouse GILT genes except for a slightly more compact intron arrangement. The LycGILT expression is obviously up-regulated in spleen and kidney after immunization with inactivated trivalent bacterial vaccine consisting of

Vibrio alginolyticus, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Aeromonas hydrophila* although it is also constitutively expressed in liver, gills, brain, and heart, suggesting that LycGILT may be involved in the immune response to bacterial challenge in large yellow croaker. A search of NCBI sequence data with LycGILT cDNA identified a pufferfish (*fugu rubripes*) GILT homologue cDNA and its genomic DNA sequence, where two putative interferon- γ activation sites (GAS) were found within the promoter region. This provided evidence that a fish GILT homologue like mammalian GILT, may also be regulated by interferon- γ (IFN- γ) through the JAK-STAT signal pathway. These results indicate that the bony fish GLIT is a functional homologue of mammalian GILT.

Finally we clone and characterize G-type lysozyme from large yellow croaker (lyc-g-lys). the full length of lyc-g-lys is 716bp encoding a protein of 193 aa, with a putative molecular weight of 21kd. The deduced protein show 40~85% homologous to other speice. The deduced amino acid sequence possesses the typical structural feature of other G-type lysozyme including catalytical residues (E71, D84, D101) and substrate binding site (L97, L121, L128, G152). Genomic analysis revealed that lyc-g-lys gene has similar exon-intron organization to other bony fish G-lysozyme gene. Expression analysis by relative quantification real time PCR shown that g-lys was unregulated about 8~10 fold in instine, spleen and kidney after the trivalent bacterial, vaccine while the expression of G-lys in other organ was not change obviously, these results indicating complexity of G-lysozyme regulation mechanism and the important role of G-lysozyme in the innate immunity. The recombinant large yellow croaker g-lysozyme expressed by yeast shown lytic activity against *M. lysodeikticus*, *A. sobria*, *V. alginolyticus*, *V. parahae molyticus*, *V. vulnificus*.

Keywords: large yellow croaker; GILT; G-type lysozyme

一、前言

1.1 大黄鱼简介

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson), 属鲈形目, 石首鱼科, 俗名黄瓜鱼、黄花鱼, 为广温广盐性集群洄游鱼类, 是中国特有的地方性鱼种, 广泛分布于北起黄海南部, 经东海、台湾海峡, 南至南海雷州半岛以东。由于大黄鱼肉质细嫩、味道鲜美, 倍受消费者的欢迎, 是我国最重要的海水经济鱼类之一。近十多年来, 在科技工作者的不断努力和探索下, 先后成功突破了大黄鱼人工繁育、网箱养殖等难关, 使大黄鱼人工养殖得到迅速发展, 养殖生产规模不断扩大, 大黄鱼已成为我国海水网箱养殖数量最大的鱼种。然而随着大黄鱼养殖规模的扩大、养殖密度的提高、养殖环境的污染以及养殖管理相对滞后, 病害问题也就相继出现, 已成为制约大黄鱼养殖业持续稳定发展的主要因素。每年由各类病害造成的经济损失达数亿元人民币。到目前为止, 养殖大黄鱼的主要疾病有寄生虫病、细菌病和病毒病。目前主要使用抗生素。而大量、盲目使用抗生素造成了药物残留、耐药性增加、污染环境等一系列不良后果[1]。对于病毒性疾病, 目前还没有有效的治疗方法。所以从大黄鱼自身的抗病能力入手, 通过提高鱼体的自身免疫力来抵御病原微生物的侵袭是一个很好的途径, 本论文试图通过构建 cDNA 文库和 EST 测序来得到大黄鱼免疫基因, 并且进一步分析鉴定这些免疫基因来为将来的水产养殖病害防治提供必要数据和初步研究。

1.2 鱼类分子免疫学研究进展

鱼类的免疫系统分为特异性免疫和非特异性免疫。鱼类特异性免疫系统的激发需要较长的时间(14d 左右), 并且温度对它也有一定的影响, 在这期间毒力较强的病原体足以将鱼致死。而天然免疫是非特异性的, 反应速度快, 一般 1—2d 即有反应, 并且温度对它影响不大[2]。目前认为鱼类天然免疫在抵抗病原体的侵袭中发挥更重要的作用。天然免疫包括非特异性免疫识别系统, 补体系统, 干扰

素系统, 非特异性细胞杀伤作用, 以及一些抗菌肽, 溶菌酶等直接杀伤分子, 下面将鱼类天然免疫的各个亚系统在近年来研究进展做一个概要的综述, 由于抗菌肽, 溶菌酶等直接杀伤分子研究较为零散不成系统, 所以本文不做综述。

1.2.1 非特异性免疫识别系统

在天然免疫系统中有大量的效应分子和效应细胞, 这些效应分子和效应细胞必须在识别自身正常细胞与入侵的病原分子以及自身凋亡细胞。一般把外来病原特有的分子结构成为病原相关分子模式 (PAMP), 而把自身凋亡细胞的特有分子叫做危险信号 (danger signal) [3], 把识别这两种分子的受体称为模式识别受体 (PRR), 或模式识别分子 (PRM) [4]。近几年在哺乳动物免疫学研究的一大热点就是 TLR (Toll like receptor) 研究, Toll 是最早在果蝇中发现[5], 目前在哺乳动物中已发现至少 11 种 Toll 同源分子, 称为 Toll 样受体 (TLR), 这些 TLR 分别识别不同的 PAMP 引发天然免疫并影响特异性免疫, 如 TLR-4 识别 LPS, TLR-3 识别 dsRNA[6]。TLR 识别系统可能是目前研究最清楚的天然免疫识别系统。但是除了 TLR 系统之外还有其他免疫识别蛋白, 如在补体系统中甘露糖凝集素 (MBL) [7], 它通过结合细菌上的甘露糖从而诱发补体反应, 在补体系统中还有其他的受体可以直接或间接识别外来病原从而引发补体反应并促进抗原提呈的作用, 比如 CR3 可以介导 C3b 调理吞噬作用, 肝细胞膜上的 C-type 凝集素 SIGN-R1 可以结合 C1q 从而在病原细胞表面引发补体反应[8]。此外还有其他的凝集素如 Dectin-1 可以识别真菌细胞表面的 beta-葡聚糖然后引发细胞吞噬作用, 另外 Dectin-1 也可以识别某些特定的 T 细胞和 B 细胞使它可能与自身免疫疾病相关, 正因为这些原因现在 DECTIN-1 正在成为非 TLR 的识别系统的一个研究热门[9]。在非 TLR 识别系统中的另一个研究热门是 NACHT-LRRs (NLRs) [10]。与 TLR 不同的是 NLR 不是膜结合蛋白, 因此它们主要识别细胞内的 PAMP, 主要是 MDP、PGN, 之后引发一系列的信号传导, 研究发现 NLR 系统跟 TLR 系统有互补的作用, 但是这个领域才刚刚开始, 还有相当多的 NLRs 的配体都还不清楚 [10]。

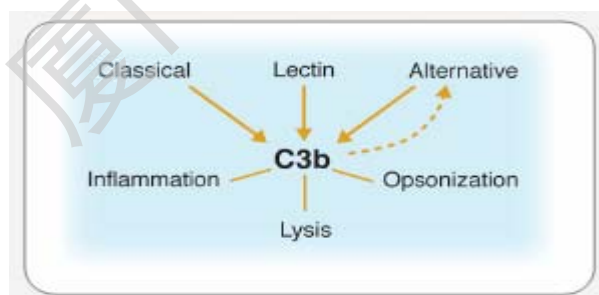
在鱼类中同样也存在复杂的 TLR 系统, 目前已经在 fugu 中找到了 12 个 TLR[11], 在 zebrafish 中找到 19 个 TLR[12], 另外在 founder, goldenfish,

carp, trout, catfish, salmon 中也都有发现 TLR, 在 goldenfish 的研究中发现 TLR 在细菌刺激之后表达量会上升[13], trout 的 TLR-3 在 poly (I:C) 诱导之后可以上调表达并在第三天达到最高峰[14], 在 zebrafish 研究中发现 TLR 1、2、5、9、20a、22、MYD88、MAL 在 *M. marinum* 感染之后表达都会增加[12]。在其他的 PRR 方面, 目前在 zebrafish、CARP, GOLDFISH 目前也克隆到 MBL 的全基因, 在 salmon 中分离到 MBL 但是它的序列资料目前尚不清楚。当然在鱼类中可克隆到其他参与天然识别的凝集素如 LPS 结合蛋白[15, 16], β 1-3 葡聚糖[17], 最近在 catfish 中发现一个新型的识别蛋白, 它可以结合细菌 oligodeoxynucleotide (ODN), 在结合 ODN 后这个蛋白可以诱发非特异性的细胞杀伤作用, 重组表达的该蛋白还有具有直接杀菌作用, 这在高等的脊椎动物中都没有报道过[18]。考虑到天然免疫在鱼体中的重要作用, 鱼体中应该有鱼类补体系统中那样特殊免疫识别的多样性 (详见后文), 可惜目前的鱼类免疫识别方面的研究还不够深入都只停留序列克隆和初步的功能分析。

1.2.2 鱼类补体系统

补体系统是最早进化出来的免疫应答系统, 在软骨鱼中就已经发现有完整的补体应答系统, 在哺乳动物它总共由 30 多个蛋白组成的复杂的级联蛋白酶切应激系统, 主要起到调理抗原以辅助抗原吞噬, 细胞裂解, 以及趋化作用。补体系统不仅在天然免疫中有重要的作用, 它们也通过调理作用辅助抗原的吞噬从而调节特异性免疫应答的水平。下面将就补体系统的活化途径, 目前已发现的鱼类补体因子, 以及鱼类补体特点做简要的介绍。[19]

哺乳动物中补体的激活途径主要有三种包括经典途径、旁路途径、凝集素途径, 在最古老的脊椎动物 jawless fish 就已经旁路途径, 和凝集素途径, 而在软骨鱼鲨鱼中已经出现了免疫球蛋白, 因而也出现经典途径。各个途径的不同主要在于形成 C3 转化酶的途径不一样。而当 C3b 形成之后, 后续激活 C5~C9 的膜攻击复合物的途径是一样。因此 C3 蛋白在整个补体系统处于中枢调节作用。



1.2.2.1 经典途径

补体激活的经典途径是由抗原抗体的免疫复合物与补体因子 C1q 结合然后激活酶切 C1r, C1s, 激活的 C1 复合物进一步酶切激活补体因子 C4 形成 C4b, C4b 继续酶切激活 C2, 形成 C4b2a, C4b2a 是 C3 转化酶可以把 C3 酶切成 C3a, C3b; C3b 与 C4b2a 结合形成 C4b2a3b, 这就是 C5 转化酶。C5 转化酶可以将 C5 酶切成 C5a、C5b, 其中 C5b 是形成膜攻击复合物的第一补体因子它可以继续酶切 C6, C7, C8, C9 形成膜攻击复合物 C5b678 (9)_n。从而裂解病原。

1.2.2.2 旁路途径

旁路途径的 C3b 形成是由 C3 因子自发水解或者由经典途径与凝集素途径中产生的 C4b 与补体调节因子 B 因子结合形成 C3bBf, C3bBf 被 D 因子酶切形成 C3bBb, C3bBb 在 P 因子稳定下可以将 C3 酶切成 C3a、C3b, 这样得到的 C3b 非常不稳定, 但是如果在反应发生的附近有病原体, 那么所得到的 C3b 可以结合在病原表面被继续循环使用形成正向反馈扩增系统从而得到大量的 C3b。另外 C3b 可以继续与 C3bBb 结合形成 C3bBb3b, 这也是一个 C5 转化酶。这样 C5 转化酶可以继续形成膜攻击复合物从而将病原体裂解掉, 同时也产生 C3a, C5a, 这两个重要的补体效应分子。

1.2.2.3 凝集素途径

凝集素的激活途径不需要 C1 因子, 它可以直接通过甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 与细菌或者病毒表面的甘露糖残基结合, 之后 MBL 可以招募甘露糖相关的丝氨酸蛋白酶 (MASP), MASP 能够直接将 C4 酶切成 C4a、C4b, 把 C2 酶切成 C2a、C2b, C4b 与 C2a 结合形成 C3 转化酶 C4b2a。C3 转化酶形成之后的途径与经典途径相同。

1.2.2.4 补体途径的扩展和进化

06 年 Kang 报道在老鼠脾脏细胞上的一种 C-type 凝集素 SIGN-R1 可以直接与补体因子 C1q 结合然后激活经典补体途径[8], 而不需要抗原抗体的免疫复合物。这是首次报道细胞表面凝集素参与经典补体途径, 也进一步扩展了我们对补体系统在病原相关分子模式的识别的认识, 也使得补体系统这一古老的研究领域可以吸引新的研究兴趣从而焕发出新的活力[20]。而在 Selander 等人在 C2 缺失性的病人身上的研究表明凝集素激活途径可以不需要 C2、C4 而直接激活 C3 的旁路途径[21], 这一研究结果第一次在体内生理环境证明了 By pass 途径的存在,

也进一步说明了 C3 可能最早进化出来的补体因子，而 C1, C2, C4 这些在经典途径的重要补体因子可能是在出现免疫球蛋白之后，为了提高补体系统的识别病原能力和作用效果进化出来。

1.2.2.5 鱼类补体系统的特点和研究进展

近年研究表明鱼类同时存在三种补体激活途径，并且它们的旁路途径活性要比哺乳动物高，这大概是由于鱼类的特异免疫受环境影响较大的缘故，鱼类补体系统的另一个重要特点是它们的补体因子大多数都有 isoforms，比如 C3 因子在哺乳动物中只有一个，而在鱼类中就由几个不同的基因表达几个不同的蛋白。而且这些不同 C3 isoforms 对不同的细菌表面的结合能力都不一样，这被认为鱼类识别不同的病原的一个重要机制。C2/Bf 因子在鱼类中也具有不同 isoforms，这样就提出一些问题是不是不同 C3 isoform 需要不同 C3 转化酶才产生这么多的 C2 isoform，以及在鱼类中活跃的旁路途径是不是因为各个特定 Bf 和 C3 才能组合出有活性的旁路 C3 转化酶，还是各种 Bf 都可以与各种 C3 结合组成类型众多的旁路 C3 转化酶[22]。

鱼类补体系统同样具有与哺乳动物类似的活性包括：细胞裂解作用，调理吞噬作用，介导炎症作用。细胞裂解作用是补体因子在细胞膜上形成膜攻击复合物导致细胞溶解，目前在多种鱼类中都发现膜攻击复合物的补体因子，在 trout 中已经克隆到 C5、C6、C7、C8- α β γ 、C9 等膜攻击复合物的补体因子并在分子水平做了详细研究[23, 24, 25, 26, 27, 28]，而在 CARP 中目前也克隆到 C8、C9 两个因子，并且分离到膜攻击复合物，分析了它的组成比例发现与哺乳动物的膜攻击复合物类似[29]。另外在 pufferfish 中也克隆到 C9[30]，而在 flounder 中则克隆到 C8- β 、C9[31]。这些研究结果表明在鱼类补体系统具有与哺乳动物类似的细胞裂解作用。补体的调理吞噬作用是指在补体酶切激活过程中产生的中间产物，如 C3a、C5a、C3b 可以结合到病原表面，然后在鱼体内的免疫细胞表面上会表达补体受体 (complement receptor, CR)，在哺乳动物中目前发现有 4 种 CR，其中参与调理吞噬主要是 CR1、CR3。CR1 的配体为 C3b/C4b，CR1 的配体为 iC3b，目前仅在 *solitary ascidian* 中克隆到一个类似于哺乳动物 CR3 的基因[32]，在 trout 的 erythrocytes 细胞中可以检测到有补体受体的调理吞噬免疫复合物的作用[33]，而且在 catfish 中还发现 Ig 对补体的调理吞噬具有协同效应

[34], 这些结果表明鱼类 CR 研究还任重而道远。最后哺乳动物中 C5a, C3a, C4a 具有过敏毒素作用它们可以作用于肥大细胞和嗜碱性细胞使之释放组胺, 引起血管扩张, 通透性增加, 平滑肌收缩及局部水肿, 其中 C5a 的过敏毒素活性最强, 另外 C5a, C3a 还有具有趋化活性促使中性粒细胞, 嗜酸性细胞和单核细胞沿浓度梯度定向运动。在鱼类中同样也有报道类似的过敏毒性的活性, 从 trout 中纯化到的三种 C3a 都可以对头肾的白细胞中激发呼吸爆发作用, 但是它们对这些细胞没有趋化作用[35], 同样从 CARP 中纯化的 C3a, C4a 对白细胞也没有趋化活性[36]。不过重组表达 trout 的 C5a 却对头肾的白细胞同时具有激发呼吸爆发和趋化活性, 并且去掉 C5a 末端的精氨酸之后, trout C5a 仍然具有趋化活性这一点跟哺乳动物的 C5a 是一样的[37]。目前已经克隆到 trout 的 C5a 受体, 并且表明它具有哺乳动物的 C5a 受体的保守结构, 但是其他的受体目前都还没有报道[38, 39], 因此在鱼类的补体受体方面的还非常缓慢。

在哺乳动物中补体系统还有许多调节因子以避免补体的反应对自身组织造成伤害, 这些调节因子包括 CR1, 促衰变因子, H 因子, C1 抑制因子, C4 结合蛋白, CD59 等, 但在目前在鱼类中仅仅在 bass 中报道了 SBP1, 它同时具有 C4 结合蛋白和 H 因子的作用[40], 所以在补体调节方面目前也还基本是一个空白。

1.2.3 鱼类干扰素系统基因研究

1.2.3.1 哺乳动物中干扰素系统简介[41]

干扰素 IFNs 是一细胞因子家族, 使其使细胞具有对病毒感染的抗性而发现的。哺乳动物中干扰素有两类, 分别为 type I interferon, type II interferon。这两种 IFN 在基因的同源性, 基因结构以及相应的受体都不一样 type I interferons 主要分成 IFN α 和 IFN β , 而这两类 IFN 又有许多亚型, type I IFN 没有内含子, 信号传导的受体是 IFNAR1/2, 而 type II IFN 只有 IFN γ , 它的基因上有三个内含子, 信号传导的受体是 IFNGR1/2。这两类 IFN 产生的细胞也不一样, 多数正常细胞都能表达 type I interferon, 如淋巴细胞, 单核/巨噬细胞, 以及成纤维细胞, 上皮细胞和内皮细胞, 而 IFN- γ 基本只在活化的 T 细胞和 NK 细胞表达。两种 IFN 都是通过 JAK-STAT 通道进行信号传导, 但是其中所涉及的细节蛋白略有不同。Type I IFN 结合在 IFNAR1/2 上激活两个与受体关联的 Janus 激酶, Tyk2

和JAK1。被激活的Tyk2和JAK1相继磷酸化STAT1和STAT2，导致后者形成STAT1:STAT2异二聚体，该异二聚体转移到核内进一步与IFN调节因子-9 (IRF-9) 结合，最后形成STAT1/STAT2/IRF9三聚体结合在启动子ISRE上(干扰素诱导应答原件)，从而启动许多效应基因的表达包括MX, PKR, 2' -5' -oligoadenylate synthases, MHC-I等基因。而IFN γ 结合在 IFNGR1/2激活了与受体结合的JAK1激酶，JAK1激酶磷酸化激活STAT1，激活的STAT1形成二聚体转到细胞核内结合在GAS位点从而启动后续的效应蛋白，包括IP10, MHC I, MHC II, 一氧化氮合成酶, NADPH, 以及一些抗病毒蛋白如PKR, 2' -5' -oligoadenylate, 所以IFN γ 不仅具有抗病毒作用，在抗细菌感染也起到重要作用。传统的研究一般认为type I IFN主要参与抗病毒作用，而type II IFN能够通过增强免疫细胞的抗原提呈能力以及增加过氧化酶的产生从而增强机体的抗细菌感染的能力，但是新近的研究发现TLR4—主要识别LPS的受体可以激活IFN β 的表达，而且表达出的IFN β 可以继续诱导IFN α 的表达[42]，type I IFN可以诱导NK细胞和T_H1表达IFN γ 从而增强免疫系统的抗细菌感染的能力，不过type I IFN也可以诱导免疫效应细胞的凋亡从而控制病毒的感染扩散，但是这种诱导凋亡的功能有时候会加剧机体对细菌感染严重程度，因而type I IFN在抗细菌方面的作用似乎好坏兼具，对不同的细菌会表现出截然不同的效应[43]。

1.2.3.2 鱼类干扰系统研究进展

尽管早在20年前就已经克隆到干扰素的基因，也一直有报道说可以在鱼类中检测的干扰素活性，但是鱼类干扰素基因的克隆却一直都没什么进展，直到2003年Altmann才用同源杂交从zebrafish中克隆到type I IFN，之后鱼类的干扰素的克隆工作就取得较快的进展[44]，目前已经从zebrafish, Atlantic salmon, (Fugu), pufferfish, and channel catfish中克隆到干扰素基因[45, 46, 47]，由于type II IFN 与type I IFN之间的序列同源性不高，所以type II IFN的克隆就相对较慢，甚至一度有人认为在鱼类中只有一种IFN，但是后来zou jun等人通过比较基因组学成功分离到了pufferfish的IFN γ [48]，目前已经在trout, catfish, zebrafish都克隆到了IFN γ [49, 50]，并且Igawa意外发现zebrafish和pufferfish中有两种IFN γ ，这与哺乳动物有很大不同，但是它们是和IL-22, IL-26, MDM1, and RAP1B紧密连锁在一起，这和哺乳动物中基因组结构是一样的，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库